



TITLE:

抗がん剤および抗がん剤投与ラット尿の突然変異誘起性に関する研究(補遺)

AUTHOR(S):

朴, 勺; 宮川, 美栄子; 吉田, 修

CITATION:

朴, 勺 ...[et al]. 抗がん剤および抗がん剤投与ラット尿の突然変異誘起性に関する研究(補遺). 泌尿器科紀要 1980, 26(7): 813-817

ISSUE DATE:

1980-07

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/122694>

RIGHT:

抗がん剤および抗がん剤投与ラット尿の 突然変異誘起性に関する研究（補遺）

滋賀医科大学医学部泌尿器科学教室（主任：友吉唯夫教授）

朴 勾

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

宮 川 美 栄 子

吉 田 修

THE MUTAGENIC ACTIVITY OF ANTI-CANCER DRUGS AND THE URINE OF RATS GIVEN THESE DRUGS: A SUPPLEMENTAL REPORT

Kyun PAK

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

(Director: Prof. T. Tomoyoshi, M.D.)

Mieko MIYAKAWA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida, M.D.)

Several anti-cancer drugs have been reported to be carcinogenic and some of these are suspected of being carcinogenic in man.

A high correlation between the mutagenicity and carcinogenicity of anti-cancer drugs has been reported. Therefore, it is very important to determine the presence of mutagens in the urine of patients treated with anti-cancer drugs.

There are some problems in the detection of mutagens in human urine in the Salmonella system. Prior to the investigation of human urine, a preliminary experiment was carried out with rats.

We have reported that nine of 21 anti-cancer drugs showed the ability to cause mutations in Salmonella typhimurium test strains and the urine from rats treated with six of 7 mutagenic drugs was mutagenic.

Six new anti-cancer drugs, ACNU, BCNU, Ifosphamide, Mithramycin, Natulan and CDDP, were tested. Three drugs, ACNU, BCNU and CDDP, showed mutagenicity. After six drugs were injected continuously into the juglar veins of rats, urine was collected through a cystostomy tube and tested for mutagenicity. The urine from rats treated with three drugs, BCNU, Ifosphamide and CDDP, was mutagenic.

は じ め に

抗がん剤の数種類に動物実験で発癌性が認められており¹⁻⁵⁾、臨床的にも chlornaphazine⁶⁾ や cyclophosphamide⁷⁻⁹⁾ の長期投与を受けた患者に膀胱癌が発生

したとの報告がある。癌化学療法の進歩に伴う長期生存例の増加やまたある種の疾患に免疫抑制剤として抗がん剤が長期使用されている現状^{10,11)}で治療のため用いた抗がん剤によって、新たな腫瘍発生がみられるという危険性を無視することはできない。

発癌物質の第一次スクリーニングとして微生物による突然変異誘起物質検出の有用性が認められ、発癌性と突然変異誘起性の高い相関が抗がん剤についても報告されている^{12,13}。抗がん剤投与を受けている患者尿中に突然変異誘起性物質が存在するか否かを検討することは、尿路腫瘍発生の機序を知るうえで重要な情報となる。

われわれは最初に抗がん剤投与を受けている患者尿について、*Salmonella typhimurium* TA98 と TA100¹⁴⁾を用いて突然変異誘起性の有無を検討したが、ヒトの尿中には histidine が高濃度に存在する¹⁵⁻¹⁷⁾ため、正常人の尿でもコロニー数が多くなり、*Salmonella* の系でヒトの尿を検討することは histidine の問題を解決しない限り困難であると考え、抗がん剤投与ラット尿について検討し報告した¹⁸⁾。今回さらに6種類の抗がん剤と、抗がん剤投与ラット尿について突然変異誘起性を検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 菌株

Salmonella typhimurium TA98 と TA100 を用いた¹⁴⁾。

2. 抗がん剤調整

1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU), 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), ifosphamide, mithramycin, matulan, cis-diamminedichloride platinum (CDDP) の6種類の抗がん剤を生理食塩水で溶解・希釈した。

3. 投与方法および採尿方法

すでに報告したごとく¹⁸⁾、体重約 200 g の Wistar 系雌ラットを使用し、エーテル麻酔下で頸静脈に 0.8 mm 直径のポリエチレンカテーテルを留置し、膀胱に 2.5 mm 直径のシリコンカテーテルを留置した。頸静脈カテーテルより生理食塩水をオートインジェク

Table 1. Mutagenicity of anti-cancer drugs.

Anti-cancer drugs	μg/plate	Revertant colonies/plate ^a	
		TA 98	TA 100
ACNU	1000	7725	2702
	100	33	105
	10	26	68
	1	38	57
BCNU	1000	247	427
	100	38	178
	10	38	77
	1	25	62
Ifosphamide	1000	33	107
	100	31	60
	10	36	63
	1	29	65
Mithramycin	50	34	64
	5	40	63
	0.5	32	61
Matulan	100	37	56
	10	31	51
	1	28	71
CDDP	100	0	2
	50	162	824
	25	921	1822
	10	9728	7152
	1	47	41
Control (saline)		36	65
Nitrofluoren ^b	100	5018	
Control (DMSO)		31	
Sodium azide	40		1505

a : average of 3 plates

b : dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO)

ターを用いて 11.4 ml/hr の速度で 2~3 時間持続注入し、その間に得た尿を control 尿とし、続いて抗がん剤溶液を同速度で 2 時間注入し、その間に得た尿を test 尿とした。それぞれの尿を 1,500 rpm で遠沈し、その上清を -20°C の冷凍庫に保存し、2~3 日後に mutation assay を行なった。

4. 試料調整

抗がん剤は各濃度のもの 0.1 ml を試料とした。尿は control 尿および test 尿を $0.45\ \mu\text{m}$ ミリポアフィルターを通して滅菌し、それぞれの尿 0.3 ml を試料とした。negative control として生理食塩水 0.1 ml を、positive control として *Salmonella typhimurium* TA98 には nitrofluoren $40\ \mu\text{g}/0.1\ \text{ml}$ dimethyl sulfoxide (DMSO), TA100 には sodium azide $100\ \mu\text{g}/0.1\ \text{ml}$ Saline を用いた¹⁹⁾。

5. Mutation assay

失作²⁰⁾の方法にしたがった。すなわち抗がん剤試料に 0.5 ml の Na-リン酸緩衝液を、尿試料には 0.3 ml の Na-リン酸緩衝液を加え、それに菌懸濁液 ($1-2 \times 10^8$ 生菌数/ml) 0.1 ml を加え、 37.0°C で 20 分間よく振盪培養した後ソフトアガーを 2 ml 加えて、アガープレートに展開し、 37.0°C で 48 時間インキュベートしてプレート上の His^+ のコロニー数を数えた。

結 果

1. 抗がん剤は Table 1 に示すごとく ACNU, BCNU, CDDP が TA98 および TA100 に突然変異起因性を示した。ifosphamide は $1,000\ \mu\text{g}$ で TA100 にて His^+ のコロニーは 107 であったが control (saline) の 2 倍以内であった。

2. ラットにおける実験結果は Table 2 に示すご

とく control 尿はすべて陰性で、CDDP の test 尿が TA98 と TA100 に、BCNU と ifosphamide の test 尿が TA100 に突然変異誘起性を示した。

考 察

McCann および Ames によって約 300 種の化学物質の突然変異誘起性が調べられたが、その結果発癌物質の 90 % に突然変異誘起性がみられ、非発癌物質の 87 % は突然変異誘起性を示さないこと²¹⁾ が明らかにされているが、今日発癌物質の短期検出法の代表的なものとして、この Ames らの方法^{14, 21, 22)} が広く用いられている。Ames らによって分離された *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100 は histidine 合成酵素の遺伝子に突然変異が起こって、histidine 要求性 (His^-) となっているもので、さらに DNA 修復能の欠除、膜透過性の増加、プラスミド導入による感受性の増大など突然変異誘起物質の検出が容易にできるようになっている。Ames test はプレート上でこの His^- が histidine 非要求性 (His^+) となる復帰突然変異をみるもので、TA98 は frameshift 型の、TA100 は塩基置換型の突然変異を起こす物質によって復帰変異されやすい。

Salmonella を用いてラット尿中の突然変異誘起物質を検討した若干の報告^{23, 24)} をみるが、いずれも metabolic cage を使用して採尿している。この方法では長時間採尿しなければ十分な尿量が得られないので、その間に尿が糞便・飼料・飲水で汚染されたり、尿中の代謝産物が変化する可能性がある。われわれはこれら従来の採尿方法の欠点を除き、抗がん剤を確実に大量に投与するため、ラットの頸静脈にカテーテルを留置し、また尿を確実に採取し糞便・飼料・飲水の混入

Table 2. Mutation assay for rat urine treated with anti-cancer drugs.

Anti-cancer drugs	dose	urine volume (ml)	Revertant colonies per plate ^a	
			TA 98	TA 100
ACNU	50 mg	17.0	33	101
Control		7.5	31	69
BCNU	20 mg	8.0	31	182
Control		4.5	28	66
Ifosphamide	500 mg	10.0	29	519
Control		9.0	29	105
Mithramycin	1.75 mg	14.5	13	71
Control		8.5	22	68
Natulan	700 mg	7.0	39	99
Control		7.5	36	83
CDDP	10 mg	20.0	910	872
Control		6.0	33	64

a: average of 3 plates

Table 3. Carcinogenicity and mutagenicity of anti-cancer drugs.

Anti-cancer drug	Carcinogenicity	Mutagenicity	Reference
ACNU	N.E.	+	12)
BCNU	+	N.E.	4)
Ifosphamide	+	+	5), 11)
Mithramycin	N.E.	N.E.	
Natulan	+	-	21), 25)
CDDP	N.E.	+	11)

N.E.: not evaluated

を防ぐため膀胱瘻を設置し、同一の個体で抗がん剤投与前後の尿を採取できる実験モデルを考案し、得られた尿の突然変異誘起性を検討した。抗がん剤の投与量は Table 1 に示すように抗がん剤そのものの mutation assay でかなり高濃度で突然変異誘起性を認めたため尿中に高濃度の代謝産物が排泄されることを期待して、ラットの LD₅₀ の約 5 倍量を投与した。この実験モデルにおける問題点は静脈内投与を行なうため薬剤が生理食塩水に溶けなければならないことで、たとえば busulfan や 6-mercaptopurine は生理食塩水に溶けないため、それらの投与尿を検討することができなかった。

CDDP はそのものでも test 尿でも *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100 に突然変異誘起性を示したが、BCNU の test 尿は TA98 で陰性にそして TA100 に弱い突然変異誘起性を示し、ACNU の test 尿は両方に陰性であった。このことは投与量・ラット体内での不活性化・排泄経路・尿中排泄の速度などの因子が関係してくると考えられた。ifosphamide はそのものでは陰性であるが、test 尿は TA100 に突然変異誘起性を示し、cyclophosphamide を用いて行なった結果¹⁸⁾と同様であった。このことは cyclophosphamide の誘導体である ifosphamide はラット体内で活性化されて尿中に排泄されることを示し、Benedict ら¹⁴⁾が *in vitro* で行なった *Salmonella*/microsome test の結果と同じであった。

われわれが今回 mutation assay を行なった 6 種類の抗がん剤について、現在までに報告されている発癌性と突然変異誘起性の関係は Table 3 に示すごとくで、BCNU, mithramycin の突然変異誘起性に関する報告はなく、これら 6 種類の抗がん剤の尿中 metabolites について突然変異誘起性を検討した報告はみられない。

結 語

1) *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100 を用いて、ACNU, BCNU, ifosphamide, natulan, mithr-

amycin, CDDP の 6 種の抗がん剤の mutation assay を行なった。ACNU, BCNU, CDDP が TA98 と TA100 に突然変異誘起性を示した。

2) われわれが考案した実験モデルにて 6 種類の抗がん剤をラットに投与し、得られた尿の mutation assay を行なった。CDDP 投与ラット尿は TA98 と TA100 に、BCNU 投与ラット尿および ifosphamide 投与ラット尿は TA100 に突然変異誘起性を示した。

この研究の一部は、厚生省がん研究助成金 (53-19) による。

文 献

- 1) Harris, C.C.: The carcinogenicity of anticancer drugs: A hazard in man. *Cancer*, **37**: 1014, 1976.
- 2) Bertazzoli, C., Chieli, T. and Solcia, E.: Different incidence of breast carcinoma or fibroadenomas in daunomycin or adriamycin treated rats. *Experientia*, **27**: 1209, 1971.
- 3) Marquardt, H., Philips, F.S. and Sternberg, S.S.: Tumorigenicity in vivo and induction of malignant transformation and mutagenesis in cell cultures by adriamycin and daunomycin. *Cancer Res.*, **36**: 2065, 1976.
- 4) Prejean, J.D., Griswold, D.P., Casey, J.C., Weisburger, E. and Weisburger, J.: Carcinogenicity studies of clinically used anticancer agents. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **13**: 112, 1972.
- 5) Stoner, G.D., Shimkin, M.D., Kniazeff, A.J., Weisburger, J.H., Weisburger, E.K. and Gori, G.B.: Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Res.*, **33**: 3069, 1973.
- 6) Thielde, T. and Christensen, B.C.: Bladder tumors induced by chlornaphazine. *Acta Medi.*

- Scand., **185**: 133, 1969.
- 7) Dale, G.A. and Smith, R.B.: Transitional cell carcinoma of the bladder associated with cyclophosphamide. *J. Urol.*, **112**: 603, 1974.
- 8) Wall, R. and Clausen, K.: Carcinoma of the urinary bladder in patients receiving cyclophosphamide. *New Engl. J. Med.*, **293**: 271, 1975.
- 9) Ansell, I.D. and Castro, J.E.: Carcinoma of the bladder complicating cyclophosphamide therapy. *Brit. J. Urol.*, **47**: 413, 1975.
- 10) Steinberg, A.D., Plotz, P.H., Wolff, S.M., Wong, V.G., Agus, S.G. and Decker, J.L.: Cytotoxic drugs in treatment of nonmalignant diseases. *Ann. Int. Med.*, **76**: 619, 1972.
- 11) Cooperating Clinics Committee of the American Rheumatism Association: A controlled trial of cyclophosphamide in rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med.*, **283**: 883, 1970.
- 12) Benedict, W.F., Baker, M.S., Haroun, L., Choi, E. and Ames, B.N.: Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella*/microsome test. *Cancer Res.*, **37**: 2209, 1977.
- 13) Seino, Y., Nagao, M., Yahagi, T., Hoshi, A., Kawachi, T. and Sugimura, T.: Mutagenicity of several classes of antitumor agents to *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, and TA 92. *Cancer Res.*, **38**: 2148, 1978.
- 14) McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 979, 1975.
- 15) McCann, J. and Ames, B.N.: The detection of mutagenic metabolites of carcinogens in urine with the *Salmonella*/microsome test. *Ann. N.Y. Aca. Sci.*, **269**: 21, 1975.
- 16) Yamasaki, E. and Ames, B.N.: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3555, 1977.
- 17) Nakamura, H. and Pisano, J.J.: Fluorescamine derivatives of histidine, histamine, and certain related imidazoles: Unique fluorescence after heating in acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**: 334, 1976.
- 18) Pak, K., Iwasaki, T., Miyakawa, M. and Yoshida, O.: The mutagenic activity of anti-cancer drugs and the urine of rats given these drugs. *Urol. Res.*, **7**: 119, 1979.
- 19) 賀田恒夫：海外文献にみる Ames 試験法の流れ。変異原と毒性, **6**: 98, 1979.
- 20) 矢作多賀江：環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について。蛋白質・核酸・酵素, **20**: 1178, 1975.
- 21) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: An assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 5135, 1975.
- 22) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D.: Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2281, 1973.
- 23) Durston, W. and Ames, B.N.: A simple method for the detection of mutagens in urine: Studies with the carcinogen 2-acetyl-aminofluorene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 737, 1974.
- 24) Wang, C.Y. and Lee, L.H.: Mutagenic activity of carcinogenic and noncarcinogenic nitrofurans and urine of rats fed these compounds. *Chemico-Biol. Int.*, **15**: 69, 1976.
- 25) Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity, USPHS Publication no.149, Washington D. C. 21) より引用。

(1980年2月8日受付)